

ОТЗЫВ

Официального оппонента Горина Дмитрия Александровича на диссертационную работу Марынич Надежды Константиновны на тему «Изучение FRET-пар с нефлуоресцирующими акцепторами», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность темы

В диссертационной работе Марынич Н.К. проводилось исследование флуоресцентных и физико-химических свойств флуоресцентных белков семейства GFP и создание FRET-сенсоров на их основе. Флуоресцентные белки, являясь уникальным генетически кодируемым инструментом исследования живых систем, позволяют получать изображения с разрешением выше, чем дифракционный предел. Это стало возможным благодаря открытию фототрансформируемых белков, т.е. способных изменять спектральные свойства под действием облучающего света. Разработка новых молекулярных инструментов на основе GFP-подобных белков является актуальной задачей, а углубление понимания фотофизических и фотохимических процессов во флуоресцентных белках необходимо для рационального использования этих инструментов. Наряду с этим, большую популярность имеют FRET-сенсоры на основе этих белков, в особенности протеазные, поскольку активность протеаз связана с развитием вирусных инфекций (включая коронавирусы, такие как SARS-CoV-2), онкологических заболеваний и воспалительных процессов. Сенсоры на такие протеазы потенциально можно использовать для создания скрининг-систем новых лекарственных препаратов.

Цель исследования и задачи

Цели и задачи сформулированы четко и отражают план работы.

Данная работа направлена на создание пар белков для резонансного переноса энергии (FRET), где один из белков выступает в роли постоянно флуоресцентного или бифотохромного флуоресцентного белка, а второй представляет собой хромопротеин. Стоит отметить, что в рамках

поставленных задач автор исследует не только прикладные, но и фундаментальные свойства GFP-подобных белков.

Научная новизна

Проведенная исследовательская работа соответствует современному состоянию науки в данной области и обладает явной новизной. В ней впервые получен вариант бифотохромного белка с заменами всех аминокислотных остатков цистеина, что делает его подходящим для применения в окислительных условиях. Было получено и детально охарактеризовано несколько вариантов этого белка с улучшенными свойствами фотоконверсии, яркости и созревании при 37°C. Изучена возможность создания FRET-пар с мономерным нефлуоресцирующим хромопротеином, получены две пары: с красным флуоресцентным белком в качестве донора и с бифотохромным флуоресцентным белком, чья красная форма выступает донором. Открыта способность белка к кристаллизации прямо в живых клетках. Отдельного внимания заслуживает получение и характеристика 3D-структуры одного из вариантов белка moxSAASot1, что вносит значительный вклад в понимание его функциональных и структурных особенностей.

Научно - практическая значимость

С практической точки зрения, данные, полученные в работе Марынич Н.К., необходимы для создания и эффективного применения GFP-подобных белков и сенсоров на их основе в качестве инструмента для изучения живых систем. Также они расширили границы понимания свойств флуоресцентных белков, что важно для моделирования свойств и их направленного изменения.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности результатов обусловлена применением широкого ряда современных физико-химических и биохимических методов. Основные положения диссертации доложены на 7 международных и всероссийских конференциях. Список статей включает 4 работы в

международных журналах. Всё это свидетельствует о высоком качестве работы и независимой экспертной оценке специалистами её результатов.

Структура диссертации

Работа представлена на 135 страницах. Работа содержит 46 рисунков и 20 таблиц. Структура построена по традиционному плану и начинается с введения, с описанием актуальности и значимости работы, затем идут 3 основные главы: «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение». Завершается работа заключением, содержащим основные выводы о проделанной работе.

В главе 1 «Обзор литературы» автор в большой степени сосредотачивает свое внимание на механизмах фотопревращений белков: фотоактивация, фотопереключение, фотоконверсия. Рассмотрено влияние аминокислотных остатков цистеина на свойства и созревание белков. Описана проблема фолдинга белков в живых клетках. Хромопротеины являются интересным объектом, например, для оптоакустической микроскопии. Подробно рассмотрены пути апоптоза: внешний, внутренний и ЭР-индуцируемый путь.

В главе 2 «Материалы и методы» автором дана характеристика методов исследования и материалов, используемых в работе. Подробно описан каждый метод. Приведены формулы, используемые для расчета кинетических констант и параметров FRET. Стоит отметить широкое разнообразие методов и их подробное описание.

В главе 3 «Результаты и обсуждение» описываются полученные автором результаты. Первая часть этого раздела посвящена подбору оптимального хромопротеина в качестве акцептора во FRET-паре, из четырех вариантов выбран мономерный Ultramarine и получен сенсор TagRFP-23-Ultramarine, имеющий высокую эффективность FRET и контрастное изменение сигнала при гидролизе сенсора каспазой-3

Вторая часть посвящена мутагенезу белка SAASot1 с целью получения бесцистеинового варианта для работы в окислительных условиях клетки. Для этого автор провел сайт-насыщающий мутагенез сразу по двум положениям и

получил два мутанта, названных moxSAASoti-T и moxSAASoti-V. Вариант moxSAASoti-T был выбран по кинетическим параметрам в качестве основного.

В третьей, четвертой и пятой частях автор проводил дальнейший мутагенез moxSAASoti с внесением замен для улучшения яркости, фотостабильности и созревания этого белка. Замены в положениях 74 и 97 оказались влияющими на эти параметры.

В шестой части проводились работы по конструированию сенсора на активность каспазы-3 с FRET-парой newmoxSAASoti-хромопротеин. Рассчитанная по временам жизни флуоресценции эффективность FRET составила 18%, сенсор также гидролизуетсЯ каспазой-3.

В заключительной части получены *in cellulo* и *in vitro* кристаллы moxSAASoti^{F97M}. Получена трехмерная структура с разрешением 1,9 Å с новой кристаллической решеткой. Это важный результат для дальнейшей рациональной разработки белка moxSAASoti.

В Заключении автором обобщены полученные данные и выделены основные результаты. Выводы соответствуют поставленным задачам, согласуются с приведенными экспериментальными данными и полностью достоверны.

Диссертация хорошо иллюстрирована. В работе встречаются незначительные опечатки, однако они не мешают восприятию текста. Текст автореферата освещает основные результаты и выводы диссертационной работы, в нем отлично виден вклад автора, а также степень новизны, теоретическая и практическая значимость результатов.

Замечания и вопросы по работе

1. Стр.65, Рисунок 9. Калибровочная кривая гель-фильтрации на носителе Superdex 200 100/20 GL. У экспериментальных точек отсутствуют доверительные интервалы.
2. Стр.73, Таблица 9. Результаты характеристики олигомерного состояния хромопротеинов методами ГФ на носителе Superdex 200 и ДСР. Значение R приведены без значений абсолютной погрешности. Можно

ли оценить абсолютную погрешность определения R , и как ее можно улучшить?

3. Стр.75-75 Время жизни флуоресценции TagRFP в сенсоре TR-23-U описывается биэкспоненциальной зависимостью (9). Имеет ли физический смысл константа c в зависимости (9)?
4. Стр.76. Таблица 11. Параметры времени жизни флуоресценции белка TagRFP в сенсоре TR-23U до и после инкубации с каспазой-3. При какой температуре проводились измерения? Как влияет температура на результаты измерений?
5. Стр.80, на трех из четырех зависимостей второй пик существенно меньше первого по амплитуде, в чем причина?
6. стр. 86, Рис 16, несоответствие подписи рисунка рисунку, в подписи есть А,Б,В,Г, на самом рисунке есть два рисунка А, и два рисунка В.
7. Стр. 89, Рис. 19. Чем обусловлен сильный шум на экспериментальных зависимостях?
8. Рис.22, Рис.27, Рис. 31, Рис.34 значения интенсивности флуоресценции приведены без погрешности.
9. Стр.110, Рис.40, А, Б,В отсутствует размерная шкала.

Заключение

Диссертация Марынич Надежды Константиновны «Изучение FRET-пар с нефлуоресцирующими акцепторами» является законченным научным исследованием. Работа выполнена и оформлена в соответствии с современными требованиями, диссертация и автореферат хорошо иллюстрированы. Достоверность полученных результатов подтверждает многообразие используемых современных методов. Результаты диссертации полно отражены в 11 печатных работах, 7 из которых являются тезисами на международных и всероссийских конференциях, 4 - статьями в журналах,

соответствующих перечню ВАК. Автореферат кратко отражает содержание диссертации и соответствует положениям, выносимым на защиту.

По объему выполненного исследования, новизне полученных результатов, их теоретической и практической значимости диссертационная работа Марынич Надежды Константиновны «Изучение FRET-пар с нефлуоресцирующими акцепторами» полностью соответствует требованиям пунктов «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством РФ от 24 сентября 2013 года №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, а ее автор заслуживает присуждения ей искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия.

Официальный оппонент

доктор химических наук (02.00.04 – Физическая химия)

профессор по специальности биофизика

профессор центра фотоники и фотонных технологий

автономной некоммерческой образовательной организации

высшего образования «Сколковский институт науки и технологий»

Горин Дмитрий Александрович

Адрес 121205, Москва, Большой бульвар д.30, стр.1.

Телефон: +79172077630

e-mail: d.gorin@skoltech.ru

04.02.2025

Подпись Дмитрия Александровича Горина удостоверяю

Г.А. С.
РУКОВОДИТЕЛЬ ОТДЕЛА
КАДРОВОГО АДМИНИСТРИРОВАНИЯ

